



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

⑩ Numéro de publication:

0 237 384
A1

⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑬ Numéro de dépôt: 87400282.7

⑭ Int. CL⁴: C 07 K 15/00

⑬ Date de dépôt: 06.02.87

C 12 P 21/00, C 12 N 5/00,
C 12 N 15/00, G 01 N 33/569,
G 01 N 33/577
//(C12P21/00,C12R1:91)

⑮ Priorité: 06.02.86 FR 8601620

⑯ Inventeur: Strosberg, Arthur Donny

⑯ Date de publication de la demande:
16.08.87 Bulletin 87/38

68 rue de Javel
F-75015 Paris (FR)

⑰ Etats contractants désignés:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

Goevec, Martine
150 rue de Tolbiac
F-75013 Paris (FR)

⑱ Demandeur: CHEMUNEX
41 rue Barrault
F-75013 Paris (FR)

Bringer, Christine
3 rue du Pont Couilly
F-77174 Villeneuve-le-comte (FR)

Fuhrmann, Benoit
7 bis rue Baussat
F-75015 Paris (FR)

⑲ Mandataire: Nony, Michel et al
Cabinet NONY & CIE 29, rue Cambacérès
F-75008 Paris (FR)

Le (Les) microorganisme(s) a (ont) été déposé(s) auprès l'Institut Pasteur (CNCM) sous le(s) numéro(s) I - 500; I - 501; I - 509.

⑳ Nouveaux anticorps anti-levures capables de reconnaître plusieurs levures ou moisissures, lignées cellulaires hybrides produisant de tels anticorps, leur préparation et leur application à la détection de levures ou de moisissures.

㉑ Anticorps polycloniques, caractérisés par le fait qu'ils sont capables de reconnaître au moins une levure et au moins une moisissure, et en particulier, anticorps polycloniques ne reconnaissant pas les fermentes lactiques : lignées cellulaires hybrides sécrétant de tels anticorps ; procédé de préparation de ces anticorps et leur application à la détection de levures et/ou de moisissures, notamment dans les produits alimentaires et en particulier dans les produits lactés.

EP 0 237 384 A1

Description

Nouveaux anticorps anti-levures capables de reconnaître plusieurs levures ou moisissures, lignées cellulaires hybrides produisant de tels anticorps, leur préparation et leur application à la détection de levures ou de moisissures.

- 5 La présente invention a pour objet des nouveaux anticorps capables de reconnaître plusieurs levures et moisissures, des lignées cellulaires hybrides produisant de tels anticorps, la préparation desdits anticorps, et leur application à la détection et éventuellement à la numération de levures ou de moisissures.
- Il est usuel dans l'industrie agro-alimentaire, de réaliser la détection de microorganismes dans les produits alimentaires par des techniques microbiologiques classiques. Certes, la culture des microorganismes 10 constitue la meilleure méthode de détection ; cependant une telle méthode a pour inconvénient d'être longue puisqu'elle nécessite de 1 à plusieurs jours pour donner des résultats utilisables et, de plus, elle ne peut être mise en œuvre que dans des laboratoires spécialisés dans la culture des microorganismes.
- Il s'est donc avéré nécessaire de pouvoir disposer de méthodes très sensibles et plus rapides, pouvant être mises en œuvre sans nécessiter l'intervention de laboratoires spécialisés. C'est ainsi qu'à été proposée 15 l'application des méthodes immunoenzymatiques, mises au point pour le diagnostic des maladies de l'homme et des maladies de l'animal, à la détection de microorganismes toxiques dans les produits alimentaires.
- La présente invention a pour but de permettre la détection et éventuellement la quantification de levures et/ou de moisissures présentes dans les substances les plus diverses, aussi bien dans le cas où les levures ou moisissures sont des constituants de ces substances, que dans le cas où elles en sont des contaminants.
- 20 Les levures et les moisissures sont des champignons, qui selon la taxonomie font partie de la division des Eumycota dans laquelle on dénombre cinq sous-divisions : les Mastigomycotina, les Zygomycotina, les Ascomycotina, les Basidiomycotina et les Deuteromycotina (Fungi Imperfecti) (Clasification des champignons selon AINSWORTH in Smith's Introduction to Industrial Mycology, A.H.S. ONIONS et al, 1981).
- On compte environ 400 levures qui comprennent notamment les genres suivants : Candida, 25 Saccharomyces, Trichosporon, Debaryomyces, Torulopsis, Cryptococcus, Brettanomyces, Hansenula, Kluyveromyces, Kloeckera, Nadsonia, Pichia, Rhodotorula, Zygospacharomyces (PROCESS BIOCHEMISTRY, November 1970) "Immunological methods in industry" I. CAMPBELL p.48).
- Les moisissures comprennent notamment les genres suivants : Penicillium, Aspergillus, Mucor, Geotrichum, Alternaria, Ulocladium, Trichoderma, Phialophora, Fusarium, Eurotium.
- 30 La reproduction des levures et des moisissures est de type végétatif avec formation d'un mycelium, et/ou de type sexué.
- Les levures et les moisissures sont des microorganismes de grande taille (supérieure à 2µm), délimitées par une paroi riche en polysaccharide (80% à 90%).
- (V. FARKAS Biosynthesis of Cell Wall of Fungi, Microbiological Reviews, June 1979 p.117-144).
- 35 Un produit alimentaire peut être contaminé par une ou plusieurs levures ou moisissures ; il faudrait donc pouvoir disposer, pour réaliser le test de détection immunoenzymatiques, non seulement d'anticorps spécifiques du contaminant qui a servi à les produire, mais également, d'anticorps dirigés contre d'autres levures et/ou d'autres moisissures.
- La présente invention a donc pour objet d'obtenir des anticorps, aussi bien polyclonaux que monoclonaux, 40 qui répondent à un besoin important, qui est celui de la détection de la présence de levures et/ou de moisissures, et notamment de levures ou moisissures contaminantes toxiques, dans différentes substances, en particulier dans des produits alimentaires, qui permettent de détecter la présence dans ces derniers de plusieurs levures et/ou de moisissures, et qui permettent la réalisation d'un test immunologique sensible et rapide, ne nécessitant pas l'intervention de spécialistes et, par suite, apte à être mis sous la forme d'une trousse de détection aisément utilisable par un personnel sans formation.
- 45 La présente invention a pour objet des anticorps polyspécifiques, caractérisés par le fait qu'ils sont capables de reconnaître au moins une levure et au moins une moisissure.
- L'invention concerne aussi de tels anticorps, qui sont capables de reconnaître en outre au moins une seconde levure.
- 50 La présente invention a notamment pour objet des anticorps anti-levure capables de reconnaître non seulement la levure utilisée pour les préparer, mais également d'autres levures et/ou moisissures.
- L'expression "anticorps-anti-levure" désigne des anticorps qui ont été obtenus par immunisation d'un animal à l'aide d'une levure.
- 55 L'invention concerne notamment des anticorps, tels que définis ci-dessus, qui sont capables de reconnaître au moins une première et une deuxième levure, différentes par leur genre ou leur espèce, prises dans le groupe constitué par les levures des genres Candida, Saccharomyces, Trichosporon, Debaryomyces, Torulopsis, Hansenula, Rhodotorula, Pichia, Cryptococcus, Kluyveromyces et Zygospacharomyces.
- Les anticorps polyspécifiques de l'invention sont en particulier ceux qui sont capables de reconnaître une 60 première levure de même espèce que la levure utilisée pour préparer lesdits anticorps, prise dans le groupe de levures qui comprend Debaryomyces hansenii, Candida pseudotropicalis, Candida tropicalis, Candida albicans, Torulopsis glabrata, Trichosporon cutaneum, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces carlsbergensis, Cryptococcus neoformans, et au moins une autre levure, différente par son genre ou son espèce, de la levure utilisée pour les préparer, et prise notamment dans le groupe des levures qui comprend Debaryomyces

hansenii, *Candida pseudotropicalis*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Torulopsis glabrata*, *Trichosporon cutaneum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Cryptococcus neoformans*.

Les anticorps de l'invention sont notamment ceux qui sont capables de reconnaître, outre au moins une levure, au moins une moisissure (sous forme de mycélium ou de spore) choisie dans le groupe constitué par les moisissures des genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Alternaria*, *Ulocladium*, *Trichoderma*, *Phialophora*, *Fusarium* et *Eurotium*. 5

Parmi les anticorps de l'invention, on citera plus particulièrement les anticorps, tels que définis ci-dessus, qui ne donnent pas de réactivité croisée, ou qui ne donnent qu'une faible réactivité croisée, par exemple au plus égale à 10%, avec au moins un ferment lactique, ce qui permet de les utiliser pour la détection de levures et/ou de moisissures contaminantes dans les produits alimentaires obtenus par fermentation lactique. Parmi ces anticorps, on mentionnera notamment ceux qui ne donnent pas de réaction croisée avec au moins un ferment lactique choisi parmi *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lacticis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus lacticis*, *Streptococcus diacetylactis*, *Lactobacillus casei casei* et *Lactobacillus casei rhamnosus*. 10

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, les anticorps polyclétiques sont constitués par une composition comprenant en combinaison au moins deux préparations d'anticorps polyclétiques tels que définis plus haut, dans le but d'étendre le domaine de détection de ladite composition d'anticorps. 15

Les anticorps polyclétiques de l'invention peuvent être des anticorps polyclonaux ou monoclonaux.

Parmi les anticorps monoclonaux, on citera en particulier ceux qui sont obtenus à partir des lignées cellulaires hybrides décrites ci-après et déposées sous les numéros I-500, I-501, I-509. 20

Les anticorps ou leurs fragments peuvent en outre être modifiés par marquage et/ou fixés sur un support solide.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'anticorps polyclétique tels que définis ci-dessus, caractérisé par le fait qu'il comprend une première étape, dans laquelle on immunise des animaux vertébrés, selon les techniques connues, et une seconde étape dans laquelle on recueille les anticorps des animaux immunisés. 25

Les animaux utilisés pour l'immunisation sont par exemple le lapin, la chèvre ou la souris.

L'immunisation est effectuée de préférence par des injections répétées de cellules de levures, et en particulier de cellules des genres mentionnés précédemment. On peut effectuer par exemple l'immunisation à l'aide de levures choisies dans le groupe constitué par *Debaryomyces hansenii*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Torulopsis glabrata*, *Trichosporon cutaneum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis* et *Cryptococcus neoformans*. 30

Selon un mode d'exécution préféré du procédé conforme à l'invention, les cellules de levures utilisées au cours de l'étape d'immunisation sont des cellules préalablement tuées par traitement thermique et/ou chimique. 35

Selon un autre mode d'exécution, pour la première injection auxdits animaux, les cellules de levures sont mises en suspension dans l'adjuvant complet de Freund ou en solution physiologique, et la deuxième injection et les injections éventuelles suivantes sont réalisées avec des cellules de levure en suspension dans de l'adjuvant incomplet de Freund ou en solution physiologique.

La seconde étape du procédé consiste à prélever du sang de l'animal immunisé et à en séparer le sérum qui contient les anticorps polyclonaux recherchés. 40

Les anticorps sériques sont ensuite isolés selon les techniques de fractionnement connues. Le sérum séparé au cours de la seconde étape est traité par exemple par chromatographie d'affinité pour recueillir la fraction d'anticorps spécifiques du sérum, dont l'utilisation permet d'augmenter la sensibilité de la détection des levures dans les milieux soumis aux tests de détection. 45

Selon un mode de mise en œuvre particulier du procédé de l'invention, au cours d'une troisième étape, les anticorps polyclétiques sont soumis à un traitement propre à rendre visible la réaction ultérieure anticorps-anticorps de détection de levures ou moisissures dans un milieu à tester, ce traitement consistant à les marquer avec un agent traceur et/ou à les fixer sur un support solide.

Les anticorps polyclétiques obtenus peuvent être soumis à un traitement d'immunoabsorption par des levures susceptibles de donner lieu à une réaction croisée, pour obtenir des anticorps monospécifiques qui reconnaissent une seule levure. Les anticorps monospécifiques ainsi obtenus peuvent être éventuellement fragmentés, marqués, et/ou fixés sur un support solide. 50

Les anticorps de l'invention peuvent être des immunoglobulines G ou M.

Dans les cas où l'on préfère obtenir les anticorps sous la forme d'immunoglobulines G (IgG), le procédé d'immunisation est réalisé de façon à provoquer une réponse immunitaire secondaire, selon les méthodes connues. On peut par exemple injecter l'immunogène une fois par semaine pendant trois semaines, puis faire un rappel au bout de deux ou trois mois. On administre l'immunogène par exemple par injection intradermique, sous-cutanée ou intraveineuse. 55

Pour sélectionner les anticorps qui sont capables de reconnaître au moins deux levures, on fait réagir la préparation des anticorps selon les techniques immunologiques connues basées sur la réaction antigène-anticorps, avec au moins une levure, autre que celle ayant servi à l'immunisation, que l'on souhaite pouvoir détecter à l'aide de l'anticorps préparé. On sélectionne de façon analogue les anticorps capables de reconnaître en outre au moins une moisissure. 60

Selon un autre mode d'exécution du procédé de l'invention, la seconde étape comprend un premier stade

qui consiste à fusionner des cellules lymphoïdes des animaux immunisés avec des cellules de vertébrés cultivables *in vitro* (cellules immortalisées) et un deuxième stade qui consiste à cloner les cellules hybrides obtenues, selon les techniques connues en soi. On sélectionne ensuite les clones sécrétant les anticorps ayant les propriétés désirées, c'est-à-dire ceux qui répondent aux critères mentionnés précédemment.

5 Au cours d'un troisième stade de la seconde étape, les clones peuvent être injectés à des animaux de la même espèce que ceux utilisés pour l'immunisation, sensibilisés par un agent approprié pour former des ascites qui produisent des quantités importantes des anticorps monoclonaux recherchés.

Les cellules mères utilisées dans l'opération de fusion cellulaire sont par exemple des splénocytes que l'on recueille selon les techniques usuelles.

10 On effectue l'étape de fusion des lymphocytes prélevés, avec des cellules provenant de lignées monoclonales cultivables *in vitro*, par exemple des cellules de myélome. On choisit de préférence des cellules de myélome non sécrétantes.

15 La fusion des cellules est une technique bien connue qui consiste essentiellement à mélanger des lymphocytes de l'animal immunisé et les cellules immortalisées provenant de lignées monoclonales, en présence d'un agent promoteur de fusion qui peut être, par exemple, le polyéthylène-glycol. On opère par exemple par la technique de KOHLER et MILSTEIN, NATURE, 256, 495-497 (1975).

20 Après incubation dans des conditions convenables, les cellules sont lavées et mises en culture sur un milieu sélectif permettant la croissance des cellules hybrides uniquement. Il est connu par exemple que les cellules de myélome, qui sont dépourvues de l'enzyme hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transférase, ne se reproduisent pas sur les milieux contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine. Dans ces conditions, les cellules n'ayant pas fusionné ne peuvent pas se reproduire sur le milieu sélectif utilisé.

25 Les cellules de myélome utilisées dans le procédé de l'invention sont par exemple des cellules de myélome de souris PIE gracieusement fournies par F. GIDOSSI DISA (Institut J. Monod, Paris). Ces cellules non sécrétantes ont été sélectionnées pour leur sensibilité à l'aminoptérine et cultivées sur un milieu approprié contenant des substances nutritives. Un tel milieu peut être constitué par exemple d'un milieu RPMI 1640 défini par Moore et al. (Culture of Normal Human Leucocytes, J.A.M.A. 199, 519-524, 1967) contenant 10% de sérum de veau foetal, 2mM de glutamine, 1mM de pyruvate de sodium, 100 UI/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine ; ce milieu sera dénommé ci-après milieu RPMI complet.

30 On sélectionne ensuite, après un temps de culture suffisant (par exemple 15 jours après la fusion) les suageants de culture contenant des anticorps répondant aux critères mentionnés ci-dessus. Pour mettre en œuvre cette sélection, on utilise les méthodes immunologiques classiques fondées sur la réaction antigène-anticorps. On utilise par exemple un test immuno-enzymatique. On effectue ensuite le clonage des cellules retenues à chaque étape des différents critères de sélection.

35 Le clonage est avantageusement effectué dans des microplaques et les trous desdites microplaques contenant des clones uniques sont ensuite sélectionnés et leur suageants sont testés, par exemple à l'aide d'un test ELISA, pour ne retenir dans un premier temps que les clones sécrétant des anticorps anti-levure qui ont une haute affinité pour la levure utilisée pour l'immunisation, et qui sont stables.

40 L'invention s'étend aux lignées cellulaires hybrides sécrétant des anticorps répondant aux critères énoncés précédemment.

45 La présente invention a également pour objet les lignées cellulaires de cellules hybrides déposées sous les numéros I-500, I-501 et I-509 décrites ci-après.

50 Les lignées cellulaires I-500, I-501 et I-509 ont été obtenues à partir de cultures d'hybridomes résultant d'une fusion somatique entre splénocytes de souris Balb/c et cellules de myélome vecteur PIE non sécrétantes (respectivement DG3 et IG7) dans un milieu de culture constitué par un milieu RPMI 1640 additionné de L-glutamine, de streptomycine, de pénicilline, de pyruvate de sodium et de sérum de veau foetal, pH 7,2, à une température de 37°C, le repliage étant effectué dès que la culture atteint $0,8 \cdot 10^6$ cellules/ml dans le milieu de culture.

55 Les anticorps obtenus selon le procédé conforme à la présente invention peuvent être conservés par exemple par congélation à -20°C. Après de fréquentes décongélation et congélation on n'a pas observé de diminution notable de leur titre.

60 Les anticorps de l'invention peuvent être marqués ou encore être fixés sur un support solide permettant leur utilisation comme agents immuno-adsorbants dans des méthodes de chromatographie d'affinité ou comme réactifs dans les méthodes d'analyse fondées sur la réaction antigène-anticorps (techniques radioimmunologiques, techniques d'immunofluorescence, techniques immunoenzymatiques, notamment).

65 L'édit support solide peut être réalisé en tout matériau solide, biologique ou synthétique, doué de propriétés adsorbantes ou capable de fixer un agent de couplage.

Ces matériaux sont connus et décrits dans la littérature. Parmi les matériaux solides capables de fixer les anticorps par adsorption, on citera par exemple le polystyrène, le polypropylène, les latex, etc... Parmi les matériaux solides utilisables pour fixer les anticorps par covalence à l'aide d'un agent de couplage, on peut citer notamment le dextran, la cellulose, leurs dérivés aminés (diéthylaminoéthylcellulose ou diéthylaminoéthyldextran), etc...

70 Le support solide peut se présenter par exemple sous forme de disques, de tubes, de baguettes, de billes, ou de plaques de microtitration.

75 Les agents de couplage permettant de fixer par covalence les anticorps sur le support solide sont des dérivés bifonctionnels tels que des dialdéhydes, des quinones, etc...

Les anticorps peuvent également être fixés sur des supports solides minéraux, par exemple selon les méthodes décrites dans les brevets français 2.319.176, 2.403.556 et 2.403.098.

Les anticorps selon l'invention conviennent particulièrement bien pour la détection de levures ou de moisissures, par exemple des levures ou des moisissures susceptibles de contaminer les produits alimentaires, notamment par les techniques d'immunofluorescence, les techniques immunoenzymatiques, en particulier la méthode ELISA, et les techniques radioimmunologiques, directes ou indirectes.

5

A cet effet, les anticorps conformes à l'invention peuvent être modifiés par marquage, notamment avec un traceur radioactif (tel que l'iode ou l'indium, par exemple), fluorescent (par exemple isothiocyanate de fluoresceine ou de rhodamine), chromogène, enzymatique (par exemple peroxydase ou phosphatase alcaline) ou colloïdal (ou par exemple).

10

L'activité enzymatique éventuellement présente sur le réactif dans la réalisation de ce test, peut être déterminée selon les méthodes connues avec un substrat approprié permettant par exemple une révélation par colorimétrie, par fluorescence, par luminescence, par potentiométrie, etc...

Avec les anticorps de l'invention, la détection peut être quantitative et permet donc d'effectuer, par les techniques immunologiques, des numérations de levures ou de moisissures dans des produits où elles sont des constituants normaux ou des contaminants.

15

L'invention concerne également l'utilisation des anticorps anti-levure tels que définis ci-dessus, dans la détection qualitative et/ou quantitative de levures ou de moisissures, en particulier dans des produits alimentaires, qu'il s'agisse de levures ou moisissures normalement présentes ou de levures ou de moisissures susceptibles de contaminer lesdits produits.

20

L'invention concerne, en particulier, l'application des anticorps polyclonaux et monoclonaux tels que définis ci-dessus, à la détection de levures et/ou de moisissures dans les produits laitiers frais (lait, crème, fromages frais, yaourts, desserts lactés, etc...).

25

La présente invention a aussi pour objet un procédé de détection et éventuellement de numération de levures et/ou de moisissures présentes normalement ou éventuellement contenues en tant que contaminants dans un produit à tester, caractérisé en ce que lesdits anticorps ou leurs fragments, sont mis en œuvre, d'une manière connue en soi, dans une méthode immunologique fondée sur la réaction antigène-anticorps, en particulier avec des anticorps marqués.

30

Outre l'application décrite ci-dessus, les anticorps de l'invention peuvent être utilisés dans un procédé d'élimination des antigènes qu'ils reconnaissent présents dans une substance liquide aqueuse à épurer, ce procédé étant caractérisé par le fait que l'on met en contact ladite substance avec lesdits anticorps fixés sur un support insoluble en phase aqueuse pour réaliser l'immunocaptage, l'immunoabsorption ou l'immunoaffinité desdits antigènes.

35

En outre, il est clair que les anticorps conformes à la présente invention, de même que les lignées cellulaires dont ils sont issus, s'appliquent à la détection qualitative et/ou quantitative de levures ou de moisissures à des fins d'analyse dans les domaines les plus divers, parmi lesquels on peut citer la biologie clinique, la médecine, la biologie générale, l'agronomie, la zoologie, la physiologie végétale et la mycologie.

40

Dans le cas de produits pâteux ou gélifiés, la mise en œuvre du procédé de détection des levures ou moisissures peut éventuellement être précédée d'une mise en condition telle que mise en suspension ou en solution, dans un solvant aqueux, du produit à tester.

45

Dans le cas où il s'agit de détecter des levures ou moisissures contaminantes, on peut ensuite recueillir lesdites levures ou moisissures éventuellement présentes dans la solution ou suspension examinée, notamment par filtration ou par centrifugation.

50

L'invention s'étend à des coffrets de détection immunologique qui contiennent, à titre de réactif immunologique, au moins un anticorps, en particulier un anticorps monoclonal, tel que défini précédemment.

45

Bien entendu, ces coffrets comprennent également les réactifs de mise en évidence de la réaction antigène-anticorps couramment utilisés dans les détections de ce type, à savoir :

a) pour les tests par immunofluorescence, des anticorps couplés à un fluorochrome ainsi que des tampons et supports appropriés ;

55

b) pour les tests par voie enzymatique : des anticorps couplés à l'enzyme, les agents révélateurs de l'activité enzymatique, les tampons et supports appropriés ;

50

c) pour les tests radioimmunologiques, des anticorps modifiés par un marqueur radioactif, ainsi que les tampons et supports appropriés.

Les exemples suivants illustrent l'invention, sans toutefois la limiter.

55

EXEMPLE 1 : Préparation d'anticorps polyclonaux chez le lapin.

1. Immunisation

On a injecté à des lapins au temps zéro 6.10^7 levures tuées, en adjuvant complet de Freund, en injection intradermique multi-points.

60

Les levures sont tuées par la chaleur (autoclavage à 120°C pendant 20 minutes).

Au temps trois semaines, un rappel est effectué. Pour cela, 6.10^7 levures sont administrées, avec de l'adjuvant incomplet, en injection sous-cutanée.

Le sang est ensuite prélevé tous les 15 jours et on en sépare le sérum.

65

Les lapins ont été immunisés avec l'une des levures suivantes :

Candida pseudotropicalis : référence CBS 607

Candida tropicalis : référence CBS 94

Debaryomyces hansenii : référence CBS 770

Candida albicans : référence CBS 562.

5

2. Essai de réponse polyclonale

Les sérum obtenus ont été testés pour déterminer leur activité anti-levure par la méthode immunoenzymatique connue sous le nom de technique ELISA.

10 Environ $5 \cdot 10^5$ levures de l'espèce utilisée comme antigène dans le protocole d'immunisation, sont séchées une nuit à 41°C sous un volume de 50µl de solution saline tamponnée au phosphate (P.B.S.) dans les micropuits d'une plaque Dynatech Immulon. Pour éviter une adsorption non spécifique des anticorps, les puits sont saturés à température ambiante pendant une heure avec du P.G.T. (phosphate-gélatine-Tween), c'est-à-dire de la gélatine à 0,25% et du Tween 20 à 0,1% dans du P.B.S.

15 "Tween 20" est une marque commerciale pour un tensioactif non ionique, le polyoxyéthylène sorbitan monolaurate.

16 Le sérum à tester est ensuite dilué de puits en puits sous un volume de 50µl. L'incubation est réalisée à température ambiante pendant 1 heure. Après lavage des micropuits avec du P.G.T., 50µl d'une dilution au 1/500 d'immunoglobulines de mouton anti-immunoglobulines de lapin couplées à la peroxydase sont ajoutés. Une série de témoins négatifs a été préparée en incubant le conjugué ci-dessus dans des puits qui ont été incubés avec un sérum pré-immun de lapin, dilué dans les mêmes conditions que le sérum à tester.

20 Après une heure d'incubation avec le conjugué, les puits sont lavés trois fois avec du P.B.S. et on ajoute ensuite le substrat enzymatique (2,5mM H₂O₂ et 2mM de 2,2'-azino-di-(3-éthyl-benzothiazoline-acide sulfonique) dans un tampon acétate-phosphate, pH=6,5). Après 30 minutes, la densité optique de chaque puits est lue dans un lecteur optique Dynatech.

25 Cette technique ELISA est utilisée pour tester les sérum polyclonaux par réaction homologue et par réactions croisées avec des levures différentes de l'antigène utilisé lors de l'immunisation.

Les résultats obtenus avec les anti-sérum anti-*C. pseudotropicalis*, anti-*C. tropicalis*, anti-*C. albicans* et anti-*D. hansenii*, sont réunis dans le TABLEAU I qui va suivre.

30

35

40

45

50

55

60

65

TABLEAU I

Pourcentage de réaction croisée de 4 antisérums
de lapins hyperimmuns

MICRO-ORGANISME	Sous-Division	ANTI-C. PSEUDO-TROPICALIS	ANTI-C. TROPICALIS	ANTI-C. ALBICANS	ANTI-D. HANSENII
CANDIDA PSEUDOTROPICALIS	FI	<u>100</u>	8	6	15
CANDIDA TROPICALIS	FI	100	<u>100</u>	100	100
CANDIDA ALBICANS	FI	100	100	<u>100</u>	100
DEBARYOMYCES HANSENII	A	100	66	73	<u>100</u>
TRICHOSPORON CUTANEUM	FI	85	16	21	23
TORULOPSIS GLABRATA	FI	26	43	64	38
CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS	FI	15	4	0	5
SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS	A	100	16	7	15
SACCHAROMYCES CEREVISAIE	A	20	5	3	21
SACCHAROMYCES CEREVISAIE MÜTTE	A	85	14	6	15
STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS		13*	0	0	0
LACTOBACILLUS BULGARICUS		13*	0	0	0

* pourcentage déterminé sur les deux souches en mélange.

• FI = fungi imperfecti ;

• A = ascomycetes.

La pourcentage de réactivité croisée est calculé par rapport à la levure utilisée pour l'immunisation (à laquelle on attribue la valeur 100).

Les microorganismes testés sont les suivants :

D. hansenii (souche CBS 770) ;
 C. tropicalis (souche CBS 94) ;
 Ferment lactique (CO 32) : mélange de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus* (fourni par BSN) ;

C. pseudotropicalis (souche CBS 607) ;
 C. albicans (souche CBS 562) ;
 S. cerevisiae mutée au niveau de sa paroi (souche LB6-50) ;
 T. glabrata (souche CBS 138) ;
 Tr. cutaneum (souche CBS 2466) ;
 Cr. neoformans (souche CBS 464) ;
 S. cerevisiae (souche CBS 1171) ;
 S. carlsbergensis (souche CBS 7003).

La référence CBS signifie CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES, BAARN (PAYS-BAS).

La souche LB6-50 est une souche de *S. cerevisiae* mutée au niveau de sa paroi (fournie par University of California, Biochemistry Department, BERKELEY, Cal.94720 C.E. BALLOU Bc 50).

3. Détection de levures par la technique ELISA

Des tests de détection des levures ont été réalisés afin de déterminer la sensibilité de la technique ELISA lors de l'utilisation de sérum polyclonaux, en utilisant du sérum de lapin anti-C. tropicalis. Le protocole décrit précédemment est légèrement modifié : les levures homologues sont diluées de puits en puits, puis séchées dans les plaques noires Dynatech. Les micropuits sont saturés avec le tampon P.G.T. durant 1 heure, puis on ajoute 50µl d'une dilution fixe de sérum de lapin anti-levure.

Après une heure, l'anticorps de mouton anti-immunoglobulines de lapin, couplé à la phosphatase alcaline, est ajouté. L'incubation est réalisée à température ambiante.

Après trois lavages en P.B.S., le substrat enzymatique est ajouté (diéthanolamine 1M, MgCl₂ 5mM, 4 méthylumbelliferyphosphate 0,1mM, pH 9,8). La lecture est effectuée sur un lecteur Microfluor Dynatech.

La sensibilité de la détection des levures est augmentée par purification des immunoglobulines par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions : DEAE TRISACRYL.

Les IgG de lapin sont élutées avec un tampon NaCl 35mM ; Tris 25mM pH 8,8.

La courbe de quantification de levures C. tropicalis par la fraction anticorps d'un sérum de lapin anti-C. tropicalis, est représentée à la figure unique annexée, avec en abscisse le nombre de levures et en ordonnée la densité optique ; dans le cas représenté le seuil minimal de détection s'est avéré être de 200 levures environ.

EXEMPLE 2 : Préparation d'anticorps monoclonaux.

1. Immunisation

On a immunisé des souris femelles Balb/c en leur injectant une fois par semaine pendant trois semaines consécutives, par voie intra-veineuse, 10⁷ levures, tuées par la chaleur par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. Après une période de repos de trois mois, les souris ont eu un rappel par voie intra-veineuse avec la même quantité de levures trois jours avant le prélèvement des splénocytes pour la fusion.

La levure utilisée pour l'immunisation a été : *Debaromyces hansenii*.

2. Fusion

Des cellules de myélome de souris PIE sont utilisées pour la fusion. Elles ont été sélectionnées pour leur sensibilité à l'aminoptérine et cultivées sur le milieu RPMI contenant 10% de sérum de veau foetal, 2mM de glutamine, 1mM de pyruvate de sodium, 100 UI/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine.

Les splénocytes ont été dispersés par injection du milieu RPMI exempt de sérum dans la rate des souris hyperimmunisées et lavés trois fois dans du milieu RPMI avant fusion.

Les cellules de myélome et les splénocytes ont été ensuite fusionnés dans un rapport de une cellule de myélome pour 10 splénocytes, en présence de 41% de polyéthylèneglycol d'un poids de 1500 (Merck) selon la méthode de KOHLER et MILSTEIN (Nature, 256, 495-497, 1975), puis lavées dans le milieu RPMI et remises en suspension dans 100ml du milieu RPMI complet. Les cellules ont ensuite été redistribuées dans des microplaques Nunclon (24 puits par plaque) à raison de 1ml/puits contenant 2,2.10⁵ cellules. Après 24 heures, on a ajouté 1ml/puits de milieu constitué du milieu RPMI complet contenant 0,1mM d'hypoxanthine, 0,4µM d'aminoptérine et 16µM de thymidine. Des parties aliquotes de milieu sélectif ont été remplacées les 3ème, 6ème et 10ème jours après la fusion. Après 15 jours, les hybridomes survivants ont été cultivés sur le milieu RPMI complet, complété avec de l'hypoxanthine et de la thymidine et, 15 jours après la fusion, on a recherché la présence d'anticorps anti-levures dans les surnageants de culture. Les clones ont été ensuite cultivés progressivement sur le milieu RPMI complet normal.

Les cultures positives ont été clonées par la méthode des dilutions limites selon OI V.T. et HERZENBERG, L.A. 1980 Immunoglobulin-producing hybrid cell lines, in "Selected Methods in Cellular Immunology" (Eds. Mishell, R.B. and Shrigi, S.M., p.351, Filman, San Francisco).

Les cellules ont été redistribuées dans les puits d'une microplaques Nunclon, à raison de 0,5 cellule en

moyenne par puits, avec 3.10^5 thymocytes à titre de cellules nutritives. Après 10 jours, les puits contenant des clones uniques ont été sélectionnés et 5 jours plus tard, les surnageants ont été testés pour déterminer la présence d'anticorps anti-levures.

Trois clones issus d'une culture primaire positive, ont été sélectionnés et injectés à des souris Balb/c pour obtenir de grandes quantités d'anticorps. A cet effet, des souris femelles agées Balb/c ont été stimulées par une injection intrapéritonéale de 0,3 ml de tétraméthyl-pentadécane. Après 4 jours, 20 millions de cellules hybrides ont été injectées aux souris. Au bout de 15 jours, les fluides d'ascites ont été récoltés et leur activité anti-levure et anti-moisissure a été testée.

Trois clones de cellules hybrides obtenus ont été déposés auprès de la Collection Nationale de Culture de Microorganismes de l'Institut Pasteur, Paris (France) sous le numéro I-501 le 6 Décembre 1985 (IG₇), I-500 le 6 Décembre 1985 (DG₃) et I-509 le 22 Janvier 1986 (IE₃).

3. Caractérisation des anticorps monoclonaux par la méthode ELISA

Les anticorps obtenus selon l'exemple 2 ont été testés pour déterminer leur activité anti-D. hansenii par la méthode immunoenzymatique connue sous le nom de méthode ELISA, décrite précédemment.

Les micropuits d'une plaque Immulon Dynatech ont été incubés avec 5.10^5 levures D. hansenii et séchés une nuit. Les puits sont ensuite saturés avec le tampon P.G.T. puis incubés avec 50µl de surnageant de culture d'hybridome ou de fluide ascitique durant 1 heure à température ambiante. Les puits sont alors lavés et on ajoute 50µl d'immunoglobulines de lapin anti-immunoglobuline de souris marquée à la peroxydase, diluées au 1/500. Après 1 heure d'incubation, trois lavages au P.B.S. sont effectués et le substrat est ajouté.

Afin de sélectionner les anticorps permettant de rechercher la présence de levures et/ou de moisissures dans le yaourt, les surnageants de culture d'hybridome sont également testés sur *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Dans ce cas, le test ELISA doit être négatif, afin d'éliminer tout anticorps susceptible de présenter une quelconque réaction croisée ultérieure lors de la recherche de levures ou de moisissures contaminantes dans le yaourt.

Les clones retenus doivent donc reconnaître D. hansenii et ne pas présenter de réaction croisée avec les fermentations lactiques.

Les hybridomes BC₄, IG₇, DG₃ et IE₃ présentent ces deux caractéristiques simultanément.

Le clonage, réalisé comme décrit précédemment, a permis d'obtenir 35 clones dont trois ont été propagés en ascites (désignés par DG₃, IE₃, IG₇).

4. Caractérisation des anticorps monoclonaux obtenus à partir des fluides ascitiques.

Les isotypes des anticorps monoclonaux obtenus dans les fluides ascitiques ont été déterminés par la méthode ELISA indirecte en utilisant des anticorps polyclonaux monospécifiques de lapin contre les différents isotypes d'immunoglobulines murines.

Les fluides ascitiques obtenus après injection d'un clone contiennent des anticorps anti-D. hansenii.

Les anticorps monoclonaux anti-D. hansenii ont ensuite été testés par la méthode ELISA afin de déterminer s'il existe ou non des réactions croisées envers des levures ou des moisissures différentes.

Dans cette expérience, on utilise 500.000 levures, ou 500.000 spores, ou 10µg de mycélium par puits. Le fluide ascistique est dilué au 1/2000 ou au 1/10.000. Les résultats obtenus montrent que les anticorps monoclonaux reconnaissent notamment D. hansenii, C. pseudotropicalis, C. albicans, C. tropicalis, T. glabrata, *Trichosporon cutaneum*, *Saccharomyces carlsbergensis*, avec des intensités comparables.

D'autres levures tels que *S. cerevisiae* et *Cryptococcus neoformans*, sont moins bien reconnues.

Ces résultats sont représentés dans le Tableau II ci-après.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

TABLEAU II

Pourcentage de réaction croisée des surnageants
 de culture (BC4) et d'anticorps monoclonaux
 (IG₇, DG₃, IE₃) anti-D. hansenii envers différentes levures
 et fermentes lactiques

MICRO-ORGANISME	Sous Division	BC4	IG7	DG3	IE3
DEBARYOMYCES HANSENII	A	100	200	100	100
CANDIDA TROPICALIS	FI	84	80	90	64
CANDIDA PSEUDOTROPICALIS	FI	77	105	75	47
CANDIDA ALBICANS	FI	95	140	80	87
TORULOPSIS GLABRATA	FI	92	95	86	45
TRICHOSPORON CUTANEUM	FI	120	100	77	91
CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS	FI	18	13	0	0
SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS	A	82	100	95	100
SACCHAROMYCES CEREVISIAE	A	32	32	18	50
SACCHAROMYCES CEREVISIAE MUTEA	A	100	120	121	130
CANDIDA UTILIS	FI	100	100+	90	90
CANDIDA LIPOLYTICA	FI		100+		100+
CANDIDA PARAPSILOSIS	FI		100+		100+
CANDIDA KRUSEI	FI		100+		100+
CANDIDA GUILLERMONDII	FI		100+		100+
CANDIDA DIDDERNSII	FI		100+		100+
CANDIDA ALBICANS	FI		100+	80	90
RHODOTORULA RUBRA	FI		80		50
PICHIA MEMBRANEFACIENS	A		100+		100+
HANSENULA SATURNUS	A	100+	80	100+	80
HANSENULA ANOMALA	A		70		80
KLUYVEROMYCES LACTIS	A		100+	100+	100
KLUYVEROMYCES FRAGILIS	A		100+		100+
KLUYVEROMYCES MARXIANUS	A		100+		100
SACCHAROMYCES POMBE	A	100+	100+	100+	90
SACCHAROMYCES ROUXII	A		80		100
SACCHAROMYCES BAILLII	A		100+		100+
SACCHAROMYCES FLORENTINUM	A		100+	90	70
ZYGOSACCHAROMYCES BAILLII	A		90		80
ZYGOSACCHAROMYCES BISPORUS	A		50		50

* FI = fungi imperfecti ;

A = ascomycetes .

Les résultats obtenus montrent en outre que les surnageants de culture BC4 reconnaissent entre autres le mycélium et les spores de *M. racemosus*, *E. repens*, *P. verrucosum*, *P. frequentans*, *P. camembertii*, *P.*

roquefortii, A. versicolor, A. fumigatus, A. tenissima, U. cartarum, T. longibrachiatum, P. malorum, G. candidum, avec des intensités comparables. Les anticorps monoclonaux (IG7, DG3, IE3) reconnaissent certaines moisissures avec des intensités comparables et certaines moisissures avec des intensités différentes. Ces résultats sont représentés dans le tableau III ci-après.

5

TABLEAU III

10

Pourcentage de réaction croisée des surnageants de culture (BC4) et d'anticorps monoclonaux (IG7, DG3, IE3) anti-D. hansenii envers différentes moisissures.

15

MICRO-ORGANISME	Sous-division* BC4	IG7	DG3	IE3
Mucor racemosus spore	Z 100+	0 8	43	
Mucor racemosus myc	Z 100+	0 10	10	
Mucor plumbeus spore	Z 57 -	0 9	10	
Mucor plumbeus myc	Z 100+	0 11	8	
Eurotium repens spore	A 100+	32 45	45	
Eurotium repens myc	A 100+	21 35	23	
Penicillium verrucosum spore	FI 45	12 33	30	
Penicillium verrucosum myc	FI 100+	0 23	30	
Penicillium frequentans spore	FI 80	0 4	30	
Penicillium frequentans myc	FI 100+	0 41	59	
Penicillium camembertii spore	FI 100+	38 40	42	
Penicillium camembertii myc	FI 100+	nd 48	30	
Penicillium roquefortii spore	FI 100+	0 9	10	
Penicillium roquefortii myc	FI 100+	43 59	44	
Aspergillus versicolor spore	FI 100+	12 13	35	
Aspergillus versicolor myc	FI 100+	0 81	73	
Aspergillus fumigatus spore	FI 89	0 13	12	
Aspergillus fumigatus myc	FI 100	nd 20	28	
Alternaria tenissima spore	FI nd	nd nd	nd	
Alternaria tenissima myc	FI 100+	nd ad	nd	
Ulocladium cartarum spore	FI nd	nd nd	nd	
Ulocladium cartarum myc	FI 100+	nd 100+	100+	
Trichoderma longibrachiatum spore	FI 100+	0 41	44	
Trichoderma longibrachiatum myc	FI 100+	87 55	70	
Phialophora malorum spore	FI 100+	43 44	51	
Phialophora malorum myc	FI 100+	nd 100+	94	
Fusarium spore	FI 100+	58 97	100	
Fusarium myc	FI 100+	nd 76	70	
Geotrichum candidum spore	FI 100+	75 97	100	
Geotrichum candidum myc	FI 100+	75 76	70	

20

25

30

35

40

45

50

55

60

* Z = zygomycotina ;
 A = ascomycotina,
 FI = fungi imperfecti (deuteromycotina).

La majorité des fermentations lactiques, notamment ceux utilisés en France dans la préparation industrielle des yaourts, n'est pas recensée.

Les résultats sont résumés dans le tableau IV ci-après :

5

TABLEAU IV

Pourcentage de réaction croisée des surnageants de culture (BC4) et d'anticorps monoclonaux (IG7, DG3, IE3) anti-D. hansenii envers différentes bactéries lactiques.

15

MICRO-ORGANISME	GROUPE	BC4	IG7	DG3	IE3
STREPTOCOCCUS THERMO-PHILUS	L*	0	0	0	0
STREPTOCOCCUS LACTIS	L	25	20	30	20
STREPTOCOCCUS DIACETYLACTIS	L	15	15	15	15
LACTOBACILLUS BULGARICUS	L*	0	0	0	0
LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS	L	0	0	0	0
LACTOBACILLUS BREVIS	L	0	0	0	0
LACTOBACILLUS HELVETICUS	L	0	0	0	0
LACTOBACILLUS HELVETICUS VAR. JUGURTI	L	0	0	0	0
LACTOBACILLUS LACTIS	L	0	0	0	0
LACTOBACILLUS CASEI RHAMNOSUS	L	11	21	16	16
LACTOBACILLUS CASEI CASEI	L	27	33	40	23
BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM	L	0	13	14	0

45

L = bactéries lactiques

50

L* = bactéries lactiques communément utilisées en fermentation yaourtière.

55

Les microorganismes testés sont les mêmes que dans l'exemple 1, sauf en ce qui concerne les fermentations lactiques qui, outre ceux mentionnés à l'exemple 1, sont les suivants :

- Lactobacillus acidophilus BSN E027
- Lactobacillus brevis BSN H001
- Lactobacillus helveticus BSN D013
- Lactobacillus helveticus var. jugurti BSN D008
- Lactobacillus lactis BSN B043
- Lactobacillus casei rhamnosus BSN F005
- Lactobacillus casei casei BSN F001
- Bifidobacterium bifidum BSN I010
- Streptococcus thermophilus BSN A107
- Streptococcus lactis BSN L032

Streptococcus diacetylactis BSN M01

Les moisissures testées étaient les suivantes :

Mucor racemosus MHN	5
Mucor plumbeus MHN	
Eurotium repens MHN	
Penicillium verucosum BSN S002	
Penicillium frequentans BSN S004	
Penicillium roquefortii MHN	10
Penicillium camembertii MHN	
Aspergillus versicolor BSN S003	
Aspergillus fumigatus BSN S007	
Geotrichum candidum ULB	
Alternaria tenissima BSN S005	
Ulocladium cartorum BSN S006	
Trichoderma longibrachiatum BSN S008	15
Phialophora malorum BSN S015	
Fusarium BSN S018	

MHN = Museum d'Histoire Naturelle de Paris (Laboratoire de Cryptogamie)

ULB = Université Libre de Bruxelles (Laboratoire de Microbiologie et d'immunologie).

EXEMPLE 3 : Recherche de levures dans le lait

La technique de détection des levures dans le lait se fait par la méthode ELISA.

Le lait contaminé est dilué dans une solution saline (P.B.S.), est réparti sous 50µl dans les puits d'une plaque Dynatechn, puis séché pendant une nuit à 41°C.

Un témoin négatif de lait non contaminé est traité dans les mêmes conditions.

Les puits sont saturés pendant une heure avec du P.G.T.

Un sérum polyclonal anti-levure de lapin est ajouté sous 50µl et au 1/400e dans les puits. Il est incubé pendant une heure à température ambiante.

Après lavage des micropuits avec du P.G.T., 50µl d'une dilution au 1/500e d'immunoglobulines de mouton anti-immunoglobulines de lapin couplées avec de la peroxydase sont ajoutés.

Après une heure d'incubation avec le conjugué, les puits sont lavés avec du P.B.S., et on ajoute le substrat enzymatique ABTS (2,2'-azino-di-3-éthyl-benzothiazoline-acide sulfonique).

Après 30 minutes, la densité optique de chaque puits est lue dans un lecteur optique Dynatech.

EXEMPLE 4 : Recherche de moisissures dans la crème fraîche

La technique de détection des moisissures dans la crème fraîche se fait par la méthode ELISA.

La crème fraîche (100 microlitres) est solubilisée, puis est filtrée sur des filtres 5,0µm d'une plaque MILLITITER (Millipore). A la crème fraîche solubilisée (200µl) obtenue, on ajoute 100 nanogrammes de mycélium de Penicillium verrucosum. Un témoin négatif de crème fraîche non contaminée est traité dans les mêmes conditions.

Les filtres sont saturés pendant une heure avec du PGT. L'anticorps monoclonal (1 microlitre de l'ascite IE3, complété à 1 millilitre) est ajouté par fractions de 50µl sur les filtres et est incubé pendant une heure à température ambiante.

Après plusieurs lavages des microfiltres avec du PGT, 50µl d'une solution au 1/500e d'immunoglobuline de lapin (origine KPL) anti-immunoglobuline de souris couplé à la peroxydase sont ajoutés.

Après une heure d'incubation avec le conjugué, les filtres sont lavés avec du PBS, et on ajoute le substrat enzymatique, le dichlorhydrate de O-dianisidine (3,3'-diméthoxybenzidine) (15mg) + 5ml méthanol + 25 ml PBS + 1µl H₂O₂ (à 30%).

Après 15 minutes, l'apparition d'une coloration rouge-brun note la présence de moisissures.

Revendications

1. Anticorps polycloniques, caractérisés par le fait qu'ils sont capables de reconnaître au moins une levure et au moins une moisissure. 55
2. Anticorps selon la revendication 1, caractérisés par le fait qu'ils sont capables de reconnaître une première levure et au moins une autre levure différente de la première par son genre et/ou son espèce.
3. Anticorps polycloniques selon la revendication 1 ou 2, caractérisés par le fait qu'ils sont capables de reconnaître au moins une première et une deuxième levure prises dans le groupe qui comprend notamment les levures des genres *Candida*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Debaromyces*, *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Hansenula*, *Kluyveromyces* et *Zygosaccharomyces*. 60
4. Anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisés par le fait qu'il sont capables de reconnaître au moins un moisissure choisie parmi celles des genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Alternaria*, *Ulocladium*, *Trichoderma*, *Phialophora*, *Fusarium* et *Eurotium*. 65

5. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisés par le fait qu'il s'agit d'anticorps polyclonaux.

6. Anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisés par le fait qu'il s'agit d'anticorps monoclonaux.

5 7. Anticorps selon la revendication 6, caractérisés par le fait qu'ils sont sécrétés par une lignée cellulaire de cellules hybrides choisies parmi les celles déposées sous les numéros I-500, I-501 et I-509 à la Collection Nationale de Microorganismes de l'Institut Pasteur.

8. Anticorps selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés par le fait qu'ils sont fragmentés par voie enzymatique ou chimique.

10 9. Anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisés par le fait qu'ils sont modifiés par marquage et/ou fixés sur un support solide.

10 10. Anticorps selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés par le fait qu'ils ne donnent pas de réactivité croisée, ou ne donnent qu'une faible réactivité croisée avec les fermentes lactiques.

15 11. Lignées cellulaires hybrides, caractérisés par le fait qu'elles sécrètent des anticorps tels que définis dans la revendication 6.

12. Lignées cellulaires selon la revendication 11, caractérisées par le fait qu'elles résultent de la culture et du clonage de cellules hybrides choisies parmi celles déposées en date du 6 Décembre 1985 sous les numéros I-500, I-501 et en date du 22 Janvier 1986 I-509, auprès de la Collection Nationale de Culture des Microorganismes de l'Institut Pasteur.

20 13. Procédé de préparation d'anticorps polyspécifiques tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé par le fait qu'il comprend une première étape, dans laquelle on immunise des animaux vertébrés, selon les techniques connues, et une seconde étape dans laquelle on recueille les anticorps des animaux immunisés.

25 14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé par le fait que l'on effectue l'immunisation à l'aide de cellules de levure.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 et 14, caractérisé par le fait que la seconde étape comprend un premier stade qui consiste à fusionner des cellules lymphoïdes des animaux immunisés avec des cellules de vertébrés cultivables in vitro, et un deuxième stade qui consiste à cloner les cellules hybrides obtenues.

30 16. Procédé de détection et éventuellement de numération de levures et/ou de moisissures présentes normalement ou éventuellement contenues en tant que contaminants dans un produit à tester, caractérisé par le fait que lesdits anticorps, tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 10, ou leurs fragments, sont mis en oeuvre d'une manière connue en sol, dans une méthode immunologique fondée sur la réaction antigène-anticorps.

35 17. Application du procédé selon la revendication 16 à la détection qualitative et/ou quantitative de levures et/ou de moisissures dans des produits alimentaires et/ou des substances biologiques.

18. Application selon la revendication 17, à la détection qualitative et/ou quantitative de levures et/ou de moisissures dans des produits lactés contenant des fermentes lactiques avec lesquels les anticorps mis en oeuvre ne donnent pas de réactions croisées.

40 19. Coffret ou trousse de détection par voie immunologique de levures dans des substances biologiques ou alimentaires, caractérisé par le fait qu'il contient outre des tampons et des supports appropriés, au moins un anticorps polyspécifique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, et des agents de mise en évidence de la réaction antigène-anticorps.

45

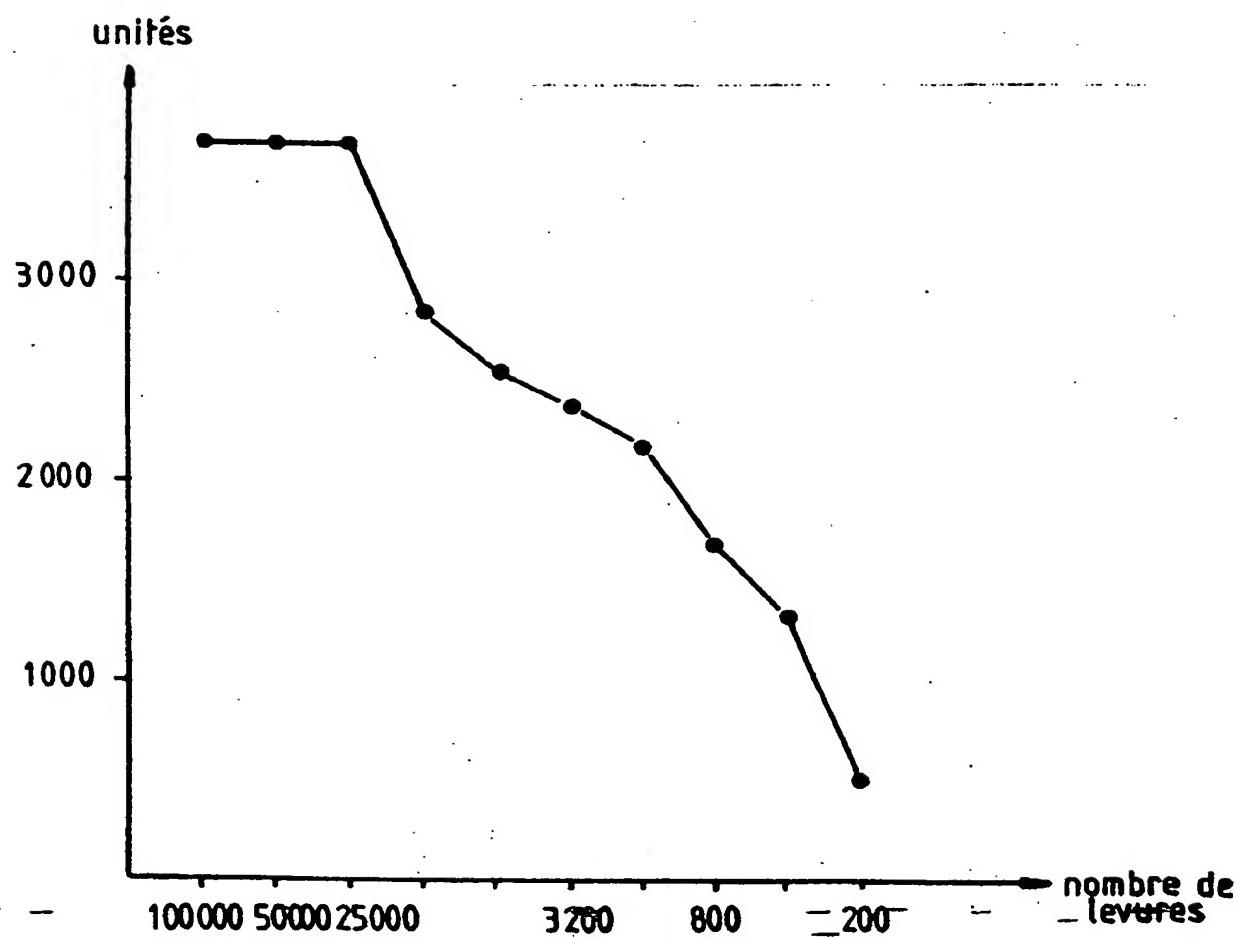
50

65

60

65

0237384





EP 87 40 0282

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
X	INFECTATION AND IMMUNITY, vol. 48, no. 3, juin 1985, pages 806-812, American Society for Microbiology; B.V. KUMAR et al.: "Cross-reacting human and rabbit antibodies to antigens of histoplasma capsulatum, candida albicans, and saccharomyces cerevisiae" * En entier *	1-5, 8, 9, 13, 14, 16	C 07 K 15/00 C 12 P 21/00 C 12 N 5/00 C 12 N 15/00 G 01 N 33/569 G 01 N 33/577// (C 12 P 21/00 C 12 R 1:91
A	--- B.D. DAVIS et al.: "Microbiology", 3ème édition, 1980, pages 836-837, Harper International Edition * Page 836, colonne de droite, ligne 28 - page 837, colonne de gauche, ligne 25 *	1-19	
A	--- J. LODDER: "THE YEASTS", 2ème édition revue et élargie, 1974, page 3, North-Holland Publishing Co., Amercian Elsevier Publishing Co., New York, US * Page 3, lignes 11-16 *	1-19	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4) C 12 P G 01 N A 61 K
A	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 93, no. 13, 29 septembre 1980, page 510, résumé no. 130551m, Columbus, Ohio, US; & JP-A-80 68 299 (SAPPORO BREWERIES, Ltd) 22-05-1980 * Résumé *	1-3, 13, 14, 16, 17	
	--- --- -/-		
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications -			
Lieu de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur	
LA HAYE	29-05-1987	CHARLES D.J.P.I.G.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul	T : théorie ou principe à la base de l'invention		
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie	E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date		
A : arrière-plan technologique	D : cité dans la demande		
O : divulgation non-écrite	L : cité pour d'autres raisons		
P : document intercalaire	& : membre de la même famille, document correspondant		



EP 87 40 0282

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			Page 2
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 4)
A	<p>FR-A-2 543 969 (KUREHA KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA) * Page 1, lignes 1-19; page 3, lignes 1-8, ligne 31 - page 4, ligne 12; page 4, ligne 21 - page 5, ligne 3; page 12, lignes 12-32; revendications 1-42 *</p> <p>---</p> <p>INFECTIOIN AND IMMUNITY, vol. 43, no. 3, mars 1984, pages 966-972, American Society for Microbiology; D.L. BRAWNER et al.: "Variability in expression of a cell surface determinant on candida albicans as evidenced by an agglutinating monoclonal antibody" * En entier *</p> <p>---</p> <p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 105, no. 23, 8 décembre 1986, page 283, résumé no. 20541w, Columbus, Ohio, US; M. VAI et al.: "Immunological cross-reactivity of fungal and yeast plasma membrane proton-ATPase" * Résumé *</p> <p>-----</p>	1-3,6 13-19	
A		1-3,6 13-16	
A		1,3,5	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 4)
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			— — —
Lieu de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur	
LA HAYE	29-05-1987	CHARLES D.J.P.I.G.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul			
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie			
A : arrière-plan technologique			
O : divulgation non écrite			
P : document intercalaire			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.